

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 46795 호
Application Number

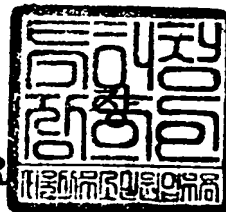
출원년월일 : 1999년 10월 27일
Date of Application

출원인 : (주)이룸바이오텍
Applicant(s)

2000 년 10 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



출력 일자: 2000/10/24

【서류명】	출원인정보변경 (경정)신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	20000509
【출원인】	
【명칭】	(주)이룸바이오텍
【출원인코드】	119990367775
【변경사항】	
【경정항목】	한글 성명(명칭)
【경정전】	주식회사 바이오로직스
【경정후】	(주)이룸바이오텍
【변경사항】	
【경정항목】	영문 성명(명칭)
【경정전】	BIOLOGIX CORPORATION
【경정후】	ERUMEBIOTECH
【변경사항】	
【경정항목】	전화번호
【경정전】	0-0-0
【경정후】	02-3479-7500
【변경사항】	
【경정항목】	인감
【경정전】	
【경정후】	
【취지】	특허법시행규칙 제9조 ·실용신안법시행규칙 제12조 ·의장법 시행규칙 제28조 및 상표법시행규칙 제23조의 규정에 의하 여 위와 같이 신고합니다.



출력 일자: 2000/10/24

【서류명】	출원인명의변경신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	1999. 12. 10
【구명의인】	
【성명】	이혜영
【출원인코드】	419990532243
【신명의인】	
【성명】	주식회사 바이오로직스
【출원인코드】	119990367775
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	919980003073
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	919980004344
【사건의 표시】	
【출원번호】	1019990046795
【출원일자】	1999. 10. 27
【심사청구일자】	1999. 10. 27
【발명(고안)의 명칭】	r p o B 유전자 단편 및 이를 이용한 결핵균과비결핵마이코박테리아의 동정방법
【변경원인】	전부양도
【취지】	특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다
【수수료】	13000
【첨부서류】	양도증 1통 인감증명서(양도인)1통 기타 법령에서 정한 증명서류(위임장(양도인, 양수인))2통

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	1999.10.27
【발명의 명칭】	r p o B 유전자 단편 및 이를 이용한 결핵균과 비결핵마 이코박테리아의 동정방법
【발명의 영문명칭】	r p o B gene fragments and method for the diagnosis and identification of Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculosis Mycobacterial strains
【출원인】	
【성명】	이혜영
【출원인코드】	4-1999-053224-3
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【발명자】	
【성명】	이혜영
【출원인코드】	4-1999-053224-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박영길
【성명의 영문표기】	PARK,Young Kil
【주민등록번호】	581203-1167819
【우편번호】	462-130
【주소】	경기도 성남시 중원구 성남동 534-1
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배길한
【성명의 영문표기】	BAI,Gill-Han
【주민등록번호】	470502-1906316

【우편번호】	463-080
【주소】	경기도 성남시 분당구 내정동 파크타운 129동 805호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김상재
【성명의 영문표기】	KIM, Sang-Jae
【주민등록번호】	410912-1079418
【우편번호】	138-050
【주소】	서울특별시 송파구 방이동 89 선수촌아파트 310동 103호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조상래
【성명의 영문표기】	CHO, Sang-Nae
【주민등록번호】	520626-1228411
【우편번호】	158-056
【주소】	서울특별시 양천구 목6동 929 한신아파트 111동 602호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김연
【성명의 영문표기】	KIM, Yeun
【주민등록번호】	740110-2232811
【우편번호】	413-900
【주소】	경기도 파주시 문산읍 문산리 56-10
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박희정
【성명의 영문표기】	PARK, Hee Jung
【주민등록번호】	711104-2051117
【우편번호】	132-041
【주소】	서울특별시 도봉구 창1동 341 동진빌라 102동 209호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 026**【서열목록의 전자문서】** 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 윤동열 (인) 대리인
 이선희 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 17 면 17,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 5 항 269,000 원**【합계】** 315,000 원**【감면사유】** 개인 (70%감면)**【감면후 수수료】** 94,500 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 유전자의 다형성에 기초하여 결핵균과 다른 마이코박테리아속 균주를 동정 및 확인하는데 이용될 수 있는 염기서열 (SEQ. ID. NO. 1~24) 및 이를 이용하여 마이코박테리아속 균주를 동정 및 확인하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 유전자를 이용한 확인방법은 보다 정확하고 신속하게 결핵균과 다른 마이코박테리아속 균주의 동정 및 확인을 가능하게 한다.

【대표도】

도 3

【색인어】

결핵균(Mycobacteria tuberculosis), 마이코박테리아(Mycobacteria)

【명세서】

【발명의 명칭】

r p o B 유전자 단편 및 이를 이용한 결핵균과 비결핵마이코박테리아의 동정방법{ r p o B gene fragments and method for the diagnosis and identification of Mycobacterium tuberculosis and non-tuberculosis Mycobacterial strains}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)의 rpoB 유전자 지도이다.

도 2는 비결핵마이코박테리아균(non-tuberculosis Microbacteria; NTM) 표준균주의 rpoB 유전자 부위(361bp)의 PCR 증폭사진이다. 도 1에서 각 레인은 다음의 균주를 표시한다: M 50bp DNA 래더(ladder) 사이즈 마커, 1 *마이코박테리움 고르도네*, 2 *마이코박테리움 스줄가이*, 3 *마이코박테리움 칸사시이*, 4 *마이코박테리움 갈리나룸*, 5 *마이코박테리움 아비움*, 6 *마이코박테리움 스크로폴라세움*, 7 *마이코박테리움 아시아티쿰*, 8 *마이코박테리움 첼로네*, 9 *마이코박테리움 모리오케세*, 10 *마이코박테리움 플레이*, 11 *마이코박테리움 폴베리스*, 12 *마이코박테리움 포르투이툼*, 13 *마이코박테리움 오스트로아프리카눔*, 14 *마이코박테리움 스메그마티스*.

도 3은 NTM 표준균주의 PCR-RFLP (MspI 분해) 산물의 전기영동사진이다. 도 3에서 레인 M 1-14는 도 2에서와 동일한 의미를 갖고, 레인 15는 *마이코박테리움 마리눔*을 표시한다.

도 4은 NTM 표준균주의 PCR-RFLP (HaeIII 분해) 산물의 전기영동사진이다. 도 4에서 레인 M 및 1-14는 도 3에서와 동일한 의미를 갖는다.

도 5는 한국결핵연구원에서 분리된 *마이코박테리움 칸사시이*(*M. kansasii*) 임상균주의 PCR-RFLP (MspI 분해 : 윗사진; HaeIII 분해; 아래사진) 산물의 전기영동사진이다. 도 5에서 레인 M은 사이즈 마커이다.

도 6은 한국결핵연구원에서 분리된 *마이코박테리움 첼로네*(*M. chelonae*)의 PCR-RFLP (MspI 분해 : 윗사진; HaeIII 분해; 아래사진) 산물의 전기영동사진이다. 도 6에서 레인 M은 사이즈 마커이다.

도 7은 결핵균의 PCR-RFLP (MspI 분해) 산물의 전기영동사진이다.

도 8은 NTM 표준균주의 하나인 *마이코박테리움 줄가이*(*M. szulgai*)의 PCR-RELP(MspI 분해)의 전기영동사진이다.

도 9는 결핵균 및 비결핵 마이코박테리아 균의 rpoB 유전자 부위의 염기서열을 배열하여 비교한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 본 발명은 신규 유전자 및 이 유전자들을 이용하여 결핵균 및 비결핵마이코박테리아균을 동정 및 확인하는 방법에 관한 것이고, 보다 상세하게는 비결핵마이코박테리아의 각 종(species)에 특이한 rpoB 유전자 단편 및 이 유전자 단편을 이용하여 결핵균과 비결핵 마이코박테리아균을 동정 및 확인하는 방법에 관한 것이다.

<11> 마이코박테리아(Mycobacteria) 속(屬: genera)에는 결핵균(

Mycobacterium tuberculosis) 및 나균(*M. leprae*)과 비결핵 마이코박테리아 (nontuberculous Mycobacteria: 'NTM')라고 불리우는 마이코박테리아 종(種: species)들이 포함된다. 1980년 이후 선진국에서는 AIDS 환자에게서 결핵을 일으키는 *마이코박테리움 아비움*(*M. avium*)에 의한 감염이 증가하는 추세에 있으며, 이는 현재 전세계 인구의 1/3 이 감염되어 있으며 해마다 300만명 이상이 사망하는 결핵관리체계에 지대한 영향을 미치고 있다.

<12> 비결핵 마이코박테리아는 1954년 Timpe와 Runyon에 의해 성장 속도, 형태와 색소 생산정도에 따라 4 군으로 분류되었다(3). 즉, 성장속도가 늦으면서 (대개 5-7일) 빛을 받고 자랄 때 노란색을 띄는 광발색균(I, photochromogens), 빛이 없는 상태에서 노란 색이나 오렌지색을 나타내는 암발색균(II, scotochromogens), 빛을 받고 자라거나 빛이 없이 자랄 때 옅은 황색을 띄거나 색을 띠지 않는 비광발색균(III, nonphotochromogens), 마지막으로 다른 Mycobacteria 보다 성장속도가 비교적 빠른 신속 발육균(rapid growers) 등으로 나누어 분류된다.

<13> 그러나 마이코박테리아에 의한 병리현상이 점점 많이 밝혀지고 다양한 종류의 균이 분리됨에 따라 이와 같은 미생물학적 특성 외에 다양한 생화학적인 특성을 이용한 분류 방법이 이용되기 시작했다. 따라서 현재 사용되고 있는 미생물학적 및 생화학적 분석에 의하면 많은 종류의 비결핵마이코박테리아를 비교적 정확하게 분석할 수 있다. 그러나 이와 같은 동정법은 균이 군집(colony)을 형성해야만 미생물학적 분류가 가능하고, 다양한 종류의 생화학적 검사를 시행할 수 있으므로 결과를 얻기까지 장기간의 시간 (8주)이 요구된다. 또한, 생화학적 검사결과가 미미한 차이에 불과한 경우 이를 어떻게 판독하느냐에 따라 동정 결과가 달라질 수 있으므로 숙달된 전문가에 의해서만 결과를 얻을 수

있으며 대부분의 임상실험실에서는 동정이 불가능한 형편이다.

<14> 미생물학적 분류와 생화학적 검사법을 기초로 한 동정법 외에 현재 선진국을 중심으로 개발되거나 사용되고 있는 비결핵마이코박테리아의 동정법은 마이코박테리아의 세포벽 성분인 지질을 색층분석기(chromatography)를 이용하여 분석하거나 분자생물학적 방법을 이용하는 방법이 주를 이루고 있다. 색층분석기(chromatography)를 이용하는 방법은 검사의 특이성이 높아 매우 유용한 방법으로 생각되나 분석에 필요한 시료를 얻기 위해 균을 배양해야 하므로 균의 성장에 필요한 시간이 소요되어 검사시간을 단축할 수 없다는 단점이 남아 있으며, 고가의 장비를 필요로 하므로 선진국을 중심으로 한 표준실험실(reference laboratory)에서만 검사가 가능하다는 단점이 있다.

<15> 한편, 진화과정 중 그 염기서열의 보존성이 높아 같은 종(種) 간에만 유전자의 변이도가 발견되는 유전자를 탐침으로 이용하는 분자생물학적 균동정법도 개발되고 있다. 이들 방법은 PCR을 사용하면 적은 수의 균으로부터 표적 유전자를 증폭할 수 있다는 장점과 증폭된 유전자의 분석을 단시간 내에 마칠 수 있는 장점이 있다. 이런 분자생물학적 방법을 이용하여 결핵균을 포함한 마이코박테리아를 동정하는 방법에 관한 연구 개발이 활발하게 진행되고 있다.

<16> 이중, 16S rRNA 유전자를 이용한 결핵균 및 결핵균외 마이코박테리아 균종

동정법으로 Genprobe사에서 생산되는 AccuProbe제품이 나와 있다. 이방법은 rRNA:표지화 DNA 하이브리다이제이션을 사용하는 방법으로 균종 동정에 2일의 시간이 소요되므로 신속하다는 장점이 있으나 16S rRNA 유전자의 경우 염기서열 보존성이 매우 높아 모든 비결핵마이코박테리아를 구별할 수 있는 변별력이 떨어진다는 단점과 각각의 마이코박테리아의 균종을 동정하기 위해 각각의 키트를 사용해야 하는 단점이 있다(4-5). 따라서 이미 개발된 바 있는 AccuProbe제품도 결핵균(*M. tuberculosis*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*) 등 5가지 균종에 대한 각각의 키트가 개발되어 있으며, 한번의 실험에 의해 한가지 균종만을 동정해 낼 수 있다는 단점이 있다.

<17> 따라서 16S rRNA 보다 더 잘 마이코박테리아 균종간을 구별해낼 수 있는 유전자 부위에 대한 탐색과 한번에 동정을 마칠 수 있는 검사법이 필요한 것으로 생각되었으며 이와 같은 요구에 따라 더 나은 다른 유전자 부위에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이중 최근에 발표된 *rpoB* 유전자 부위는 16S rRNA 보다 더 잘 마이코박테리아 균종간을 구분할 수 있는 유전자 부위인 것으로 보인다. 이 유전자 부위를 PCR을 이용하여 증폭하고 이 PCR 산물의 염기를 분석하게 되면 정확한 균 동정이 가능한 것으로 생각되며, 특정 제한 효소를 사용하게 되면 결핵균과 비결핵균을 구분할 수 있는 것으로 보인다. PCR 산물의 직접염기분석(direct sequence analysis)은 일반적인 임상실험실에서는 수행되기 어려운 고도의 분자생물학적 장비와 기술을 요구하는 방법으로 임상실험실에서 일상적으로 사용하기 어렵다는 단점이 있어 실용화되기는 어려울 것으로 생각된다.

<18> 한편, PCR 산물의 염기를 분석하는 번거로움 대신 PCR 산물을 여러 가지 제한효소, 즉 *Bst*EI, *Hae*III, *Msp*I, *Hinf*I, *Bsa*HI 등으로 절단하여 절단물의 크기와 숫자의 차이점을 비교함으로써 증폭된 유전자의 유전적 다형성(polymorphism)을 구별하고, 이를 이용하여 마이코박테리아 균종을 구분해 내는 방법인 PCR-제한효소 단편 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism; 'RFLP')법도 개발된 바 있다. 이 방법은 PCR 산물의 염기분석 방법에 비해 훨씬 간단하지만 유전자의 다형성이 마이코박테리아 균종을 구분해 낼 수 있을 정도로 다양해야 하는 한편, 각 균종에 속하는 균주간에는 잘 보존되어 있어야 하는 양면성을 갖고 있어야 한다.

<19> 이와 같은 목적에 부합하는 유전자 부위로 *dnaJ* 유전자, 16S-23S rRNA 스페이서 영역(spacer region)과 65kDa 단백질의 유전자 부위 등의 연구되어 발표된 바 있다. PCR-RFLP는 PCR 산물의 염기서열 분석법에 비하여 훨씬 간편하여 실험적 기술면으로 볼 때는 임상실험실에서 이용할 수 있는 가능성이 가장 크다고 볼 수 있다. 그러나 최근까지 개발된 방법은 두 개 이상의 제한 효소를 사용해야만 정확한 균의 동정이 가능할 뿐 아니라, 유전자 절편의 크기의 차이가 매우 미미하여 유전자 절편의 분석을 위한 컴퓨터와 고가의 소프트웨어를 장만하거나 숙달된 인력이 필요하다는 애로사항이 존재하고 있다. 이는 현재까지 PCR-RFLP에 사용되고 있는 표적유전자의 다형성이 각 종을 구분해 내기에 적당치 않은 결과로 볼 수 있을 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<20> 따라서, 종간(種間)에 존재하는 유전자의 보존도가 충분히 높아 유전자의 동질성에 의해 특정한 마이코박테리아로 동정할 수 있으며, 동시에 각 종간에 존재하는 유전자의 다형성에 의해 이를 이용한 PCR-RFLP 및 DNA-하이브리다이제이션(hybridization) 방법

등의 다양한 분자생물학적 분석에 의해 각 종간의 차이를 명확히 알아낼 수 있는 모든 마이코박테리아에 존재하는 유전자 부위가 비결핵마이코박테리아의 동정법 개발이 강력하게 요망되어 왔다.

- <21> 본 발명자들은 위와 같은 특성에 부합되는 유전자 부위에 대한 탐색에 들어갔으며, 그 결과 본 연구를 통해 처음 밝혀진 *rpoB* 유전자 상의 361bp에 해당하는 유전자 부위가 신속, 간편, 정확한 비결핵마이코박테리아의 동정법 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있는 유전자 부위임을 밝혀낼 수 있었고, 본 발명은 이러한 발견에 기초를 두고 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <22> 본 발명은 비결핵마이코박테리아 균의 동정에 이용될 수 있는, 모든 마이코박테리아에 공통으로 존재하는 보존성(conservativity)을 가지면서도 종간에 구별되는 다형성(polymorphism)을 갖는 유전자 단편 SEQ. ID. NO. 1 ~ 4 및 SEQ. ID. NO. 6 ~ 24를 제공한다.

- <23> 본 발명은 또한 상기 서열을 이용하여 결핵균과 비결핵 마이코박테리아 균을 동정 및 확인하는 방법을 제공한다.

- <24> 본 발명은 다음 단계:

- <25> (1) 서열목록의 서열번호(SEQ. ID. NO.) 1 내지 24로 표시된 염기서열중 어느 하나를 갖는 유전자 단편을 제한효소로 절단하고 얻어진 단편들의 길이 다형성(length polymorphism) 패턴을 얻는 단계:

- <26> (2) 동정하고자 하는 미생물로부터 DNA를 분리하는 단계:

- <27> (3) 상기 DNA를 증폭시키는 단계:

- <28> (4) 상기 증폭된 DNA를 상기 단계 (1)에서와 동일한 제한효소로 절단하는 단계:
- <29> (5) 상기 단계 (4)에서 얻어진 제한효소 절단 단편들의 길이 다형성(length polymorphism) 패턴을 얻는 단계: 및
- <30> (6) 상기 단계 (5)에서 얻어진 패턴과 상기 단계 (1)에서 얻어진 패턴을 비교하는 단계
- <31> 를 포함함을 특징으로 하는 마이코박테리아(Mycobacteria) 속 균주의 동정방법.
- <32> 상기 단계 (1)은 단계 (6)의 비교단계 이전에 어느 단계에서 실시하여도 무방하다.
- <33> 본 발명의 동정방법에 사용될 수 있는 제한효소는 *HaeIII* 또는 *MspI*이다. *HaeIII* 혹은 *MspI*으로 동정이 어려운 균주는 *Sau3A1* 또는 *BstEII*를 사용하여 구분이 가능하다.
- <34> 이하 구체적인 실험 방법 및 결과를 갖고 본 발명을 보다 상세히 설명하지만, 본 발명이 이들에만 국한되는 것은 아니다.
- <35> 재료 및 방법
- <36> 1. 마이코박테리아 균종
- <37> 본 실험에 사용된 결핵균 및 비결핵 마이코박테리아의 표준 균종은 표 1에 표시하였다.
- <38>

【표 1】

균 주	ATCC NO.
마이코박테리움 앱세수스(<i>M. abscessus</i>)	
마이코박테리움 아시아티쿰(<i>M. asiaticum</i>)	25276
마이코박테리움 아비움(<i>M. avium</i>)	25291
마이코박테리움 아이키엔스(<i>M. aichiense</i>)	27280
마이코박테리움 아우룸(<i>M. aurum</i>)	23366
마이코박테리움 아프리카눔(<i>M. africanum</i>)	25420
마이코박테리움 오스트로아프리카눔(<i>M. austroafricanum</i>)	
마이코박테리움 보비스(<i>M. bovis</i>)	19210
마이코박테리움 보비스 BCG(<i>M. bovis</i> BCG)	
마이코박테리움 첼로네(<i>M. chelonae</i>)	35749
마이코박테리움 셀라툼(<i>M. celatum</i>)	51131
마이코박테리움 플라베센스(<i>M. flavecense</i>)	
마이코박테리움 포르투이툼(<i>M. fortuitum</i>)	6841
마이코박테리움 갈리나룸(<i>M. gallinarum</i>)	
마이코박테리움 길룸(<i>M. gilvum</i>)	43909
마이코박테리움 고르도네(<i>M. gordonae</i>)	14470
마이코박테리움 가스트리(<i>M. gastri</i>)	15754
마이코박테리움 헤모필룸(<i>M. haemophilum</i>)	29584
마이코박테리움 인트라셀룰라레(<i>M. intracellulare</i>)	13950
마이코박테리움 칸사시이(<i>M. kansasii</i>)	12478
마이코박테리움 말모엔스(<i>M. malmoense</i>)	29571
마이코박테리움 마리눔(<i>M. marinum</i>)	927
마이코박테리움 모리오케세(<i>M. moriokaese</i>)	
마이코박테리움 페레그리눔(<i>M. peregrinum</i>)	14467
마이코박테리움 플레이(<i>M. phlei</i>)	11758
마이코박테리움 풀베리스(<i>M. pulveris</i>)	
마이코박테리움 스크로풀라세움(<i>M. scrofulaceum</i>)	19981
마이코박테리움 스줄가이(<i>M. szulgai</i>)	35799
마이코박테리움 스메그마티스(<i>M. smegmatis</i>)	
마이코박테리움 테레(<i>M. terrae</i>)	15755
마이코박테리움 투베쿨로시스(<i>M. tuberculosis</i>)	
마이코박테리움 울서란스(<i>M. ulcerans</i>)	19423
마이코박테리움 제노피(<i>M. xenopi</i>)	
노카르디아 브라실리크로스(<i>Nocardia brasiliensis</i>)	
노카르디아 노바(<i>Nocardia nova</i>)	
로도코커스(<i>Rhodococcus</i>)	

<39> 2. DNA 분리 및 PCR 증폭

<40> 표 1에 나타난 균주들을 배양하고, 배양된 균주 1 백금이 정도를 0.4 ml의 ddH₂O가

들어있는 1.5 ml 들이 튜브에 넣고 약 10분동안 끓이거나 혹은 15분간 멸균하였다. 이어서 필요에 따라 원심분리를 하였다.

<41> PCR 반응의 조성은 KCl 50mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), MgCl₂ 1.5 mM, 젤라틴 0.001% (w/v), dNTP 각각 200 μ M, *Taq* 1.25U, 프라이머 10 pmole이다. PCR 반응은 변성 온도 95℃에서 5분동안 1 사이클, 변성 온도 94℃에서 1분, 어닐링 온도 58℃에서 1분, 연장(elongation) 온도 72℃에서 1분인 사이클을 35번, 그리고 마지막으로 최종 연장 온도 72℃에서 10분간 수행하였으며, PCR 증폭에 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같다.

<42> MOTTrpo-5': 5'-TCAAGGAGAAGCGCTACGA-3' (SEQ. ID. NO. 25)

<43> MOTTrpo-3': 5'-GGATGTTGATCAGGGTCTGC-3' (SEQ. ID. NO. 26)

<44> PCR이 끝난 후 5 μ l 정도의 시료를 취하여 1.5% 아가로스 겔 전기영동을 행함으로써 PCR이 성공했는지의 여부와 산물의 크기 (361 bp)를 확인하였다.

<45> 3. PCR-RFLP

<46> PCR 결과를 확인하여 원하는 크기의 산물이 합성되었음이 확인되면 이중 500 ng 정도의 DNA에 해당하는 17.5 μ l의 시료를 취하여 총 20 μ l의 반응부피로 5 U의 *Msp*I 제한효소와 2 μ l의 10X 완충액을 사용하여 PCR 산물을 절단하였다. 37℃에서 1시간 이상 반응시킨 후 5 μ l의 5X DNA 로딩 완충액을 섞은 뒤 4% 메타포르 아가로스 겔 전기영동 (metaphor agarose gel electrophoresis)으로 절단된 PCR 산물을 분석하였다. 이때 DNA 사이즈 마커로는 100 bp 래더 (MBI Fermentas, Amherst, NY)를 사용하였다. 한편, *마이코박테리움 보비스* (*M. bovis*) DNA을 양성 대조군으로 사용하여 PCR을 수행하고 이 PCR

산물의 *MspI* 절단 산물을 내부 대조 사이즈 마커로 사용하였다.

<47> 4. PCR 산물의 클로닝 및 염기서열 분석

<48> 각 NTM의 ATCC 표준주를 이용하여 PCR을 수행하고 이 PCR 산물을 Geneclean (Bio101)을 이용하여 아가로스 겔로부터 정제하였으며 이를 TOPO- TA 클로닝 키트 (In vitrogen)의 TOPO-TA 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 PCR 산물에 대해 염기분석을 완료하였다.

<49> 결과

<50> 1. 표준균주를 이용한 *rpoB* 유전자의 PCR-RFLP 분석

<51> 한국결핵연구원에서 보유하고 있는 NTM 표준균주 (ATCC에서 분양 받음) 중 33여종의 마이코박테리아 (Mycobacteria) 균주와 노르카디아 (Norcadia), 로도코커스 (Rhodococcus) 등에 속하는 3 종류의 균주로부터 게놈 DNA를 분리하고 서열번호 25 및 26으로 나타낸 MOTTrpo 프라이머 쌍을 이용하여 *rpoB* 유전자 부위의 PCR을 수행하였다. PCR 결과 만들어진 산물들을 2% 아가로스 겔 전기영동으로 확인해 본 결과, 예상한 바대로 361 bp의 크기를 갖는 *rpoB* 유전자 부위의 효율적인 증폭이 일어났음을 볼 수 있었다 (도 2). 효과적으로 증폭된 각 균주의 PCR 산물을 제한효소 *MspI* (도 3)과 *HaeIII* (도 4)로 각각 처리한 뒤, 4% 메타포르 아가로스 전기영동을 이용하여 DNA 절편을 분석한 결과, 각 PCR 산물의 특이성에 따라 각기 다른 크기와 숫자의 DNA 절편이 나타남을 볼 수 있었다.

<52> 2. 결핵연구원에서 분리된 임상분리 NTM 균주를 이용한 *rpoB* 유전자의 PCR-RFLP 분석

<53> 위의 실험에서 얻은 PCR-RFLP 양상이 ATCC에 속하는 표준 균주에만 존재하는 것이 아니

라 임상에서 분리된 임상분리된 동일한 종에 속하는 NTM 균주에서도 지속적으로 발견되는 특성인지의 여부, 및 같은 종에 속한 임상분리균주 간에 잘 보존되어 있는 종특이적 양상인지의 여부를 확인하기 위하여, 임상분리된 균주를 대상으로 *rpoB* 유전자 부위의 PCR-RFLP 분석을 수행하였다. 임상분리균주는 한국결핵연구원의 균 동정팀에 의하여 미생물, 생화학적 검사 결과를 기초로 동정된 바 있는 임상분리 균주 중, 임상적 의의나 분리빈도 면에서 의미가 있다고 생각되는 10가지 종에 속하는 109개의 균주를 택하여 실시하였다. 위에서 기술된 바 대로 PCR을 수행하고 그 PCR 산물을 확인한 뒤, *MspI*과 *HaeIII* 제한효소를 사용하여 DNA를 절단하고 4% 메타포르 아가로스 전기영동을 행하여 결과를 분석하였다 (도 5 내지 도 8).

<54> 도 5는 *마이코박테리움 칸사시이* 임상균주의 DNA와 MOTT_{Trpo} 프라이머를 이용하여 *rpoB* 유전자 부위를 증폭하고 증폭된 PCR 산물 DNA를 *MspI* (윗 사진)과 *HaeIII*(아래 사진) 제한효소로 절단하고 전기영동하여 얻은 결과이다. 도 5에서 알 수 있듯이, 모든 *마이코박테리움 칸사시이* 균주의 *rpoB* 유전자를 이용한 PCR-RFLP 결과는 동일하다. 따라서, 모든 *마이코박테리움 칸사시이* 균주의 *rpoB* 유전자 부위의 염기서열은 잘 보존되어 있으며 *rpoB* 유전자 부위의 염기서열을 이용하여 *마이코박테리움 칸사시이* 균주를 동정할 수 있음을 알 수 있다.

<55> 도 6은 *마이코박테리움 첼로네*(*M. cheonae*) 임상균주를 이용한 실험 결과이며, *마이코박테리움 칸사시이*를 이용한 결과와 유사한 결과가 얻어졌음을 알 수 있다. 즉, 모든 *마이코박테리움 첼로네* 임상균주 간의 *rpoB* 유전자 부위를 이용한 PCR-RFLP 결과는 동일하며, 이는 모든 *마이코박테리움 첼로네* 균주에 존재하는 *rpoB* 유전자 부위의 염기서열은 잘 보존되어 있음과 *rpoB* 유전자 부위의 염기서열이

*마이코박테리움 첼로네*의 균동정에 사용될 수 있는 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

<56> 다만, *마이코박테리움 첼로네*의 경우에는 *마이코박테리움 첼로네 첼로네*(*M. chelonae chelonae*)와 *마이코박테리움 첼로네 앵세수스*(*M. chelonae absessus*)의 두 아종(subspecies)을 종래의 생화학적 방법으로는 구분하기 어려운 점이 있어 이 두 아종을 한 데 묶어 *마이코박테리움 첼로네* 콤플렉스로 동정하여 왔는데, *rpoB*를 이용한 PCR-RFLP 방법을 사용한 결과를 볼 때에도 4번 레인과 11번 레인에 있는 *마이코박테리움 첼로네 첼로네*와 다른 레인에 존재하는 *마이코박테리움 첼로네 앵세수스*가 PCR-RFLP 패턴에서 서로 구분해 내기가 매우 어려울 정도로 유사한 만큼 두 아종이 매우 유사한 유전자 염기서열을 갖고 있을것으로 생각되었다. 그러나, 4번 레인과 11번 레인에 있는 *마이코박테리움 첼로네 첼로네*와 다른 레인에 존재하는 *마이코박테리움 첼로네 앵세수스*가 PCR-RFLP 패턴이 조금은 차이가 있는 것으로 보아 두 아종의 *rpoB* 유전자 서열간에 차이가 있을 것으로 생각되며, 이들 두 아종의 *rpoB* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *BstEII* 제한효소를 상요하면 명확히 구분해 낼 수 있음을 알게되었다.

<57> 한편 위의 두 실험을 통해 *MspI* 제한효소 처리만으로도 대부분의 균종간의 차이를 볼 수 있음과 같은 균종간에는 *MspI*으로 처리된 DNA 절편의 프로필이 유사하게 나타남을 볼 수 있었으므로 이후 임상균주를 이용한 실험은 *MspI* 제한효소만을 처리하였다. 도 7과 도 8은 *마이코박테리아* 임상균주의 *rpoB* 유전자 부위를 PCR-RFLP 분석한 결과의 몇 예로 결핵균(도 7) 및

마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*) 등 균주의 MspI 제한효소 프로필이 유사하여 균주의 동정에 사용될 수 있음을 확인할 수 있다. 이외에도, 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 테레(*M. terrae*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*) 등 다양한 NTM 임상균주를 이용한 실험을 수행하였으며 (도시하지 않음), 그 결과 NTM 임상균주의 *rpoB* 유전자 부위를 PCR-RFLP 분석함으로써 균의 동정에 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

<58> 3. 임상적 의의가 있는 NTM 표준균주의 *rpoB* 유전자 절편의 염기서열 분석

<59> 질병과 관련되어 발견되는 비결핵 마이코박테리아는 가장 많이 발견되는 종은 마이코박테리움 아비움-인트라셀룰라레 콤플렉스(*M. avium-intracellulare* complex)를 비롯하여, 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 마이코박테리움 앵세수스(*M. abscessus*) 등이며, 드물게 발견되는 병원성균으로서 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 아시아티쿰(*M. asiaticum*), 마이코박테리움 레노피(*M. xenopi*), 마이코박테리움 시미에(*M. simiae*), 마이코박테리움 스크로플세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 논크로모게니쿰(*M. nonchromogenicum*), 마이코박테리움 스메그마티스(*M. smegmatis*), 마이코박테리움 페레그리눔(*M. peregrinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*), 마이코박테리움 헤모필룸(*M. haemophilum*), 마이코박테리움 울서란스(*M. ulcerans*) 등이 있고, 비병원성으로 간주되나 종종 발견되는 비결핵마이

코박테리아 종으로 *마이코박테리움 테레*(*M. terrae*), *마이코박테리움 고르도네*(*M. gordonae*) 등이 있다.

<60> 이중 임상적 의의가 있는 것으로 생각되는 총 20 종 (*M. tuberculosis* 포함 24 균주: *M. gordonae* 4 균주)의 *rpoB* 유전자 부위를 PCR을 이용하여 증폭하고 염기를 분석하였다. 각 균주의 *rpoB* 유전자 부위 중 본 실험을 통해 분석된 총 염기의 길이는 PCR 산물 크기인 361 bp이지만 이전에 보고가 된 바 있는 C-말단 쪽의 126 bp를 제외하고 본 실험을 통하여 새로이 분석된 235 bp 길이의 *rpoB* 유전자 절편의 염기 서열은 서열목록의 서열번호 1 내지 24에 나타낸 바와 같다.

<61> 4. PCR-RFLP 결과와 염기분석 결과를 기초로 한 NTM 동정의 알고리즘

<62> 다양한 NTM 표준균주와 임상균주의 PCR-RFLP 분석을 통해 얻은 PCR-RFLP 프로파일과 PCR 산물의 염기서열의 제한효소 부위 분석을 통해 얻은 데이터를 분석하여 PCR-RFLP를 이용한 NTM 균주 동정을 위한 알고리즘을 작성하였다(도 9).

<63> 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 보존성이 매우 높은 유전자 부위와 다형성을 나타내는 부위가 잘 분리되어 있음을 알 수 있다. 따라서 다형성이 매우 높은 부위의 유전자를 서명 유전자(signature gene)로 사용하여 NTM 동정에 사용할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<64> 본 발명의 유전자 및 이를 이용한 PCR-RFLP 기법은 기존의 방법과 비교하여 여러 가지 장점을 가지고 있다. 종래의 미생물학적 혹은 생화학적 방법에 의한 결과에 비해 매우 신속하게 검사를 마칠 수 있어 검사자의 시간과 노력이 훨씬 덜 소요된다는 장점과 함께

, 구분하기 애매한 여러 균주를 정확하게 검사해 낼 수 있다는 더 큰 장점이 존재한다. 따라서 기존의 생화학적 동정방법을 이용시에 그 결과를 얻기까지 수개월이 소요되었을 뿐 아니라, 경우에 따라서는 반복적인 검사로도 분명한 동정이 어려웠던 균종들을 PCR-RFLP 방법을 이용하여 신속하고 정확하게 구분해낼 수 있다.

<65> 참고문헌

- <66> 1. The bacillus tuberculosis and the contagiousness of phthisis. *Bost Med Surg J.* 108:235, 1883.
- <67> 2. Alvarez E., Tavel E.: Recherches sur le bacille de Lustgarten. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, 3rd series, 6: 303, 1885.
- <68> 3. Timpe A, Runyon EH: The relationship of 'atypical' acid-fast bacteria to human disease: A preliminary report. *J Lab Clin Med.* 44: 202, 1954.
- <69> 4. Kox LFF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM and Kolk AHJ: PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of Mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 33: 3225-3233, 1995.
- <70> 5. Sanguinetti M, Posteraro B, Ardito F, Zanetti S, Cingolani A, Sechi L, de Luca A, Ortona L and Fadda G: Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay

for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. 36: 1530-1533, 1998.

- <71> 6. 박영길, 심명섭, 조상현, 배길한, 김상재. 1994. 핵산중합효소 연쇄반응에 의한 결핵균 검출을 위한 여러 가지 primer의 비교. 대한미생물학회지 29(3): 263-268.
- <72> 7. 배길한. 1992. Rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by the amplification of rRNA sequences. 27(5): 443-448.
- <73> 8. 보건사회부 대한결핵협회. 1965, 1970, 1975, 1980, 1985, 1990. 대한민국결핵실태조사서
- <74> 9. Bai, G. H., Park, K. S., and Kim, S. J. : Clinically isolated mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* from 1980 to 1990 in Korea. *J. Kor. Soc. Micro.* 28(1): 1-5, 1993.
- <75> 10. O'brien, R. J., Geiter, L. J., and Snider, D. E. : The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 1007-1014, 1987.
- <76> 11. Contreras, M. A., Cheung, O. T., Sanders, D. E., and Goldstein, R. S.: Pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 149-152, 1988.
- <77> 12. Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T. and Botiger, E. C.: Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40(4): 323-330. 1990.

- <78> 13. Bai, G. H. : Rapid identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* by the amplification of rRNA sequences. *J. Kor. Soc. Micro.* 27(5): 443-448, 1992.
- <79> 14. Woese, C. R. : Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271, 1987.
- <80> 15. Gobel, U. B., Geiser, A., and Stanbridge, E. J. : Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1969-1974, 1987.
- <81> 16. Rossau, R., Van Mechale, E., Ley, J. and van Heuverswijn, H.: Specific *Neisseria gonorrhoeae* DNA-probes derived from ribosomal RNA. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1735-1745, 1989.
- <82> 17. Gail, L. W. and Washington II., J. A. : Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* : Review of microbiologic and clinical aspects. *Rev. Inf. Dis.* 9(2): 275-294, 1987.
- <83> 18. Lee, Z. M., Bai, G. H., and Morris, S. L. : The rapid detection of nontuberculous mycobacteria in stool samples using PCR. Presented at 93rd ASM Meeting. U.S.A., 1994.
- <84> 19. Runyon, E. M. : Anonymous mycobacteria if pulmonary disease. *Med. Clin. North. Am.* 43: 273-290, 1959.
- <85> 20. Wayne, L. G., and Kubica, G. P. : Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897, 63, p.1436-1459. In P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E. Sharpe, and J.G.Holt(ed.) *Bergey's*

manual of systemic bacteriology, Vol 2. The Williams 2 Wilkins Co., Baltimore, 1986.

- <86> 21. Jenkins, P. A.: Lipid analysis for the identification of mycobacteria. *An appraisal. Rev. Infect. Dis.* 3: 382-866, 1981.
- <87> 22. Collins, D. M. G. W. De Lisle : Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *Am. J. Vet.Ras.* 47: 2226-2229, 1986.
- <88> 23. Rubina, P., J. T. Kuach, and P. Mounts : Isolation and restriction endonuclease analysis of mucobacterial DNA. *J. Gen. Microbiol.* 132: 541-551, 1986.
- <89> 24. Garcia, M. J. and E. Tabares : Separation of *Mycobacterium gadium* from the rapidly growing mucobacteria on the basis of DNA homology and restriction endonuclease analysis. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2265-2269, 1986.
- <90> 25. Srackebrandt, E. and J. Smida : The phylogeny of the genus *Mycobacterium* as determined by 16S rRNA sequences, and development of DNA-probes. p. 244-250. *Biology og Acinomycetes*. Tokyo, 1998.
- <91> 26. Stahl, D. A., and J. W. Urbance : The division between fast and slow-growing species corresponds to the natural relationships among the mucobacteria. *J. Bacteriol.* 192: 116-124, 1990.
- <92> 27. Pitulle, C., Dorsch, W., Kazda, J., Wolters, J., and Stackebrandt, E. : Phylogeny of radidly growing members of the genus

Mycobacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 337-343, 1992.

- <93> 28. Wallace, R. J., Tschen, J.A. and Stone, M. S.: Spectrum of disease due to rapidly growing mucobacteria. *Rev. Inf. Dis.* 5: 657-679, 1983.
- <94> 29. Tsukamura, M., H. Shimoide, A. Kuse : Epidemiologic studies of lung disease due to mucobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Rev. Inf. Dis.* 3(5): 997-1007, 1981.
- <95> 30. Jenkins, P. A. : Mycobacteria in the environment. *J. Appl. Bact. Sym. Suppl.* 70: 1375-1415, 1991.
- <96> 31. Woods, G. L. and T. A. Washington II. : Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* : Review of microbiologic and clinical aspects. *Rev. Inf. Dis.* 9(2): 275-294, 1987.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열목록의 서열번호(SEQ. ID. NO.) 1 내지 4 또는 6 내지 24로 표시된 염기서열중 어느 하나를 갖는 유전자 단편.

【청구항 2】

다음 단계:

(1) 서열목록의 서열번호(SEQ. ID. NO.) 1 내지 24로 표시된 염기서열중 어느 하나를 갖는 유전자 단편을 제한효소로 절단하고 얻어진 단편들의 길이 다형성(length polymorphism) 패턴을 얻는 단계:

(2) 동정하고자 하는 미생물로부터 DNA를 분리하는 단계:

(3) 상기 DNA를 증폭시키는 단계:

(4) 상기 증폭된 DNA를 상기 단계 (1)에서와 동일한 제한효소로 절단하는 단계:

(5) 상기 단계 (4)에서 얻어진 제한효소 절단 단편들의 길이 다형성(length polymorphism) 패턴을 얻는 단계: 및

(6) 상기 단계 (5)에서 얻어진 패턴과 상기 단계 (1)에서 얻어진 패턴을 비교하는 단계

를 포함함을 특징으로 하는 마이코박테리아(Mycobacteria) 속 균주의 동정방법.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 단계 (1)과 단계 (5)의 길이 다형성 패턴은 전기영동에 의해 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 제한효소는 *HaeIII*, *MspI*, *Sau3A1* 또는 *BstEII*임을 특징으로 하는 방법.

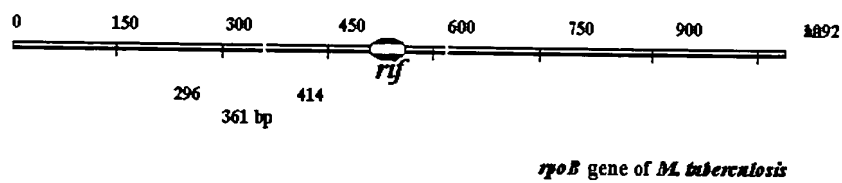
【청구항 5】

제 2항 내지 제4항중 어느 한항에 있어서, 상기 마이코박테리아 속 균주는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아비움(*M. avium*), 마이코박테리움 앱세수스(*M. abscessus*), 마이코박테리움 플라베센스(*M. flavescence*), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 첼로네(*M. chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*M. celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*M. fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*M. gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*M. gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*M. haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*M. intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*M. kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*M. malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*M. marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*M. szulgai*), 마이코박테리움 테레(*M. terrae*), 마이코박테리움 스크로폴라세움(*M. scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*M. ulcerans*) 또는 마이코박테리움 제노피(*M. xenopi*)임을 특징으로 하는 방법.

【도면】

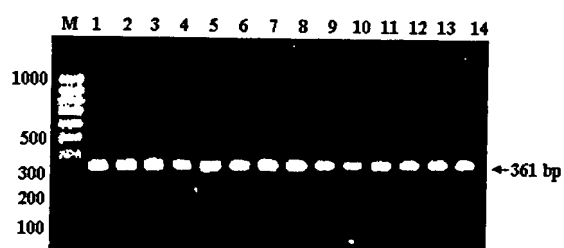
【도 1】

Fig. 1



【도 2】

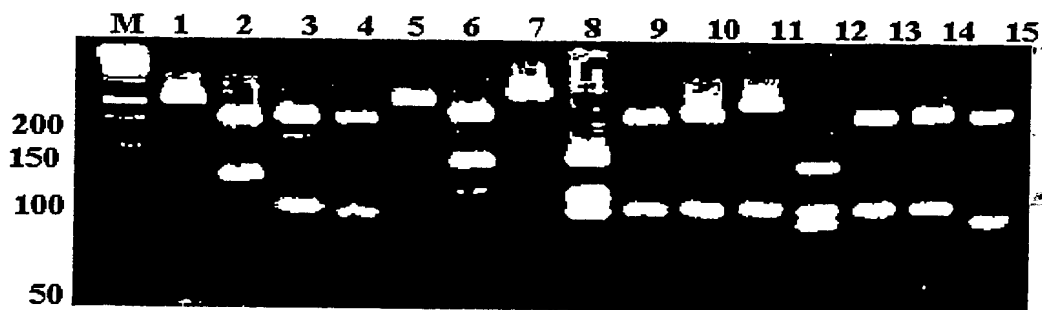
Fig. 2 PCR amplification of ATCC strains



【도 3】

Fig. 3 *MspI* digested

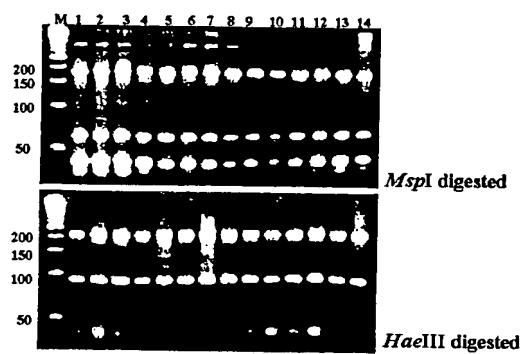
【도 4】

Fig. 4 *HaeIII* digested

【도 5】

PRA of clinical strains of *M. kansasii*

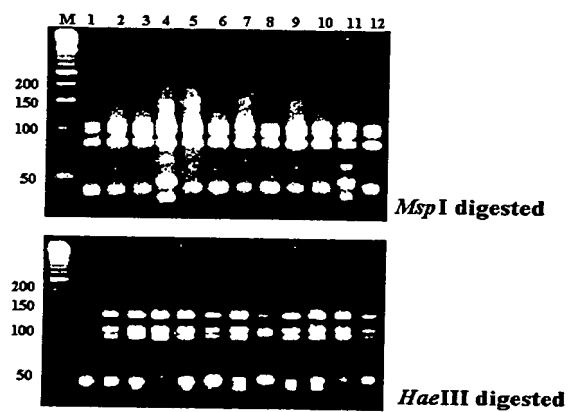
Fig. 5



【도 6】

PRA of clinical strains of *M. chelonae*

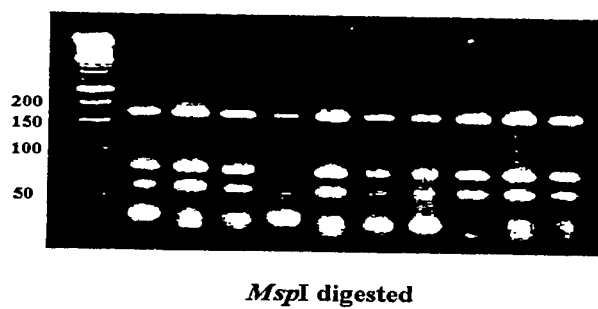
Fig. 6



【도 7】

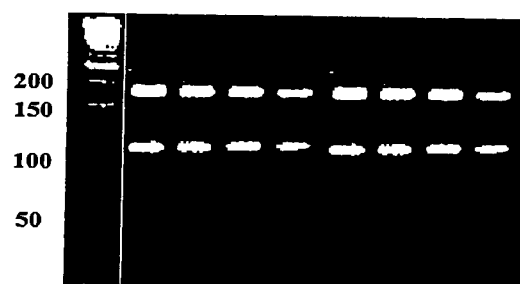
PRA of clinical strains of *M. tuberculosis*

Fig. 7



【도 8】

PRA of Clinical strains of *M. szulgai*



38-31

【서열목록】

<110>; LEE, Hyeyoung <120>; Genes specific for species of
 Mycobacteria and a method for diagnosis, identification and
 characterization of *M. tuberculosis* and other Mycobacteria <130>;
 pa99168 <160>; 26 <170>; KOPATIN 1.5 <210>; 1 <211>;
 208 <212>; DNA <213>; *Mycobacterium gordonae* I <400>; 1
 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg taggccgcta caaggtcaac aagaagctcg 60 gcctgcacg
 cggcgatccg atcaccagct ccacgtgac cgaggaagac gtcgtcgcca 120 ccatcgagta cctggtccg
 ctgcacgagg gccagcacac gatgaccgtc ccgggcggca 180 ccgaggtgcc ggttgagacc gacgacat
 208 <210>; 2 <211>; 208 <212>; DNA <213>;
Mycobacterium gordonae II <400>; 2 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg
 tgggccgcta caaggtcaac aagaagctcg 60 gtctgaacgt cggcaagccg atcaccagct cgacgtga
 cgaggaagac gtcgtagcca 120 ccatcgagta cctggtgcgg ctgcacgagg gtcagtcggc gatgaccgt
 cccggcggcg 180 ccgaggtgcc ggtggagacc gacgacat
 208 <210>; 3 <211>; 208 <212>; DNA <213>;
Mycobacterium gordonae III <400>; 3 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgtg
 tcggcccgcta caaggtcaac aagaagctcg 60 gcctgcacgt cggcgatccg atcaccagct ccacgtga
 cgaagaagac gtcgtcgcca 120 ccatcgagta cctggtccgt ctgcacgagg gtcagcacac gatgaccgt
 ccgggcggca 180 ccgaggttcc ggtggagacc gacgacat
 208 <210>; 4 <211>; 207 <212>; DNA <213>;
Mycobacterium gordonae IV <400>; 4 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgtg

tcggccgcta caaggtcaac aagaagctgg 60 gcctgcatgt cggcgatccg atcaccagct cgacgctga
 cgaagaggac gtcgtcgcca 120 ccatcgagta cctgggtccgc ctccacgagg gtcagcacac gatgacgtt
 cgggcgggac 180 cgaggttccg gtggagaccg acgacat

207 <210> 5 <211> 208 <212> DNA <213>

Mycobacterium tuberculosis <400> 5 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg

tcggtcgcta taaggtcaac aagaagctcg 60 ggctgcatgt cggcgagccc atcacgtcgt cgacgctga
 cgaagaagac gtcgtggcca 120 ccatcgaata tctgggtccgc ttgcacgagg gtcagaccac gatgaccgt
 ccgggcggcg 180 tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat

208 <210> 6 <211> 208 <212> DNA <213>

Mycobacterium terrae <400> 6 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tcggtcgcta

taaggtcaac aagaagctcg 60 ggctgcatgt cggcgagccc atcacgtcgt cgacgtgac cgaagaaga
 gtcgtggcca 120 ccatcgaata tctgggtccgc ttgcacgagg gtcagaccac gatgaccgtt ccgggcggc
 180 tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat 208

<210> 7 <211> 214 <212> DNA <213> Mycobacterium

chelonae <400> 7 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tgggccgta caaggtgaac
 aagaagctgg 60 gtcttggcgg tgccaacccg gctctggtga ctgccaccac gtcaccgag gaagacgtc
 120 tcgccaccat cgggtacctg gtgcgcctgc acgagggccca gaccacgatg accgcccccg 180

gcggcctcga ggtcccggtc gaggtcgacg acat 214

<210> 8 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium

kansasii <400> 8 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgtg tcggccgata caaggtcaac

aagaagctgg 60 gcctgaacac caatcatccg atcaccacga cgacgtgac cgaagaagac gtcgtcgcc

120 ccatcgagta tctgggtccgc ctgcacgagg gccaggccac gatgaccgtg ccgggcgggg 180

tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat 208

<210> 9 <211> 223 <212> DNA <213> Mycobacterium

scrofulaceum <400> 9 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tcggccgcta caaggtcaac

aagaagctgg 60 gtctgcacgc cggcgagccg atcacgtcgt ccacgtgac cgaggaagac gtcgtcgcg

120 ccatcgaata cctgggtccgg ctgcaccacg cccgtacgga tggccagccc gccgtcatga 180

ctgtccccgg cggcatcgag gtgccggtgg agaccgacga cat 223

<210> 10 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium

ulcerans <400> 10 tcaaggagaa gcgctacgac ctggctcgcg tgggtcggtta caaggtcaac

aagaagctcg 60 gcctgaacgc cggccagccc atcaccagct cgacgtgac cgaggaagac gtcgtcgcc

120 ccatcgaata cctgggtccgc ttgcacgagg gccagaccgc gatgaccgtt ccgggcgggtg 180

tcgaggtgcc ggtcgagacc gacgacat 208

<210> 11 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium

marinum <400> 11 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg tgggcccggta caaggtcaac

aagaagctcg 60 gcctgaacgc cggccagccc atcaccagct cgacgtgac cgaggaagac gtcgtcgcc

120 ccatcgaata cctgggtccgc ttgcacgagg gccagaccgc gatgaccgtt ccgggcgggtg 180

tcgaggtgcc ggtcgagacc gacgacat 208

<210> 12 <211> 207 <212> DNA <213> Mycobacterium

szulgai <400> 12 tcaaggagaa gcgctacgac ctggctcgcg cggccgttac aaggtcaaca

aaaagctcgg 60 tctgaacgtc ggcgagccga tcaccagttc gacgtgacc gaagaggatg tcgtcgcca

120 catcgagtac ctggttcggc tgcacgaggg ccagaccacg atgaccgttc ccggcggcac 180

cgaggtgccg gtggagaccg acgacat 207

<210> 13 <211> 223 <212> DNA <213> Mycobacterium
gastri <400> 13 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tcggccgcta caaggtcaac
aagaagctgg 60 gcctgaacac cgatcatccg atcaccacca cgacgtgac cgaagaagac gtcgtcgcc
120 ccatcgagta cctggttcgc ctgcaccacg cctctcaggg tggccaggcc cccgttatga 180
ctgtccccgg cggggtcgag gtgccggtgg aaaccgacga cat 223

<210> 14 <211> 214 <212> DNA <213> Mycobacterium
malmoense <400> 14 tcaaggagaa gcgctacgac ctggccaggg ttggccgtta caaggtcaac
aagaagctcg 60 ggctgccggc ggccgagtcg gccgtaccg cctcgaccac gctgaccgaa gcggatgtc
120 tcgccaccat cgagtacctg gtgcgcctgc acgagggcca ggcaacgatg acggttcccg 180
gcggcgtcga ggtgccggtg gagaccgacg acat 214

<210> 15 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium
avium <400> 15 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg tgggcccgcta caaggtcaac
aagaagctcg 60 gcctgcacgc cggtagaccg atcaccagct cgacgtgac cgaggaagac gtcgtcgcc
120 ccatcgagta cctgggtcgc ctgcacgagg gtcagcccac gatgaccgtc cccggcggca 180
tcgaggtgcc ggtggagacc gacgacat 208

<210> 16 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium
bovis <400> 16 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tcggtcgcta taaggtcaac
aagaagctcg 60 ggctgcatgt cggcgagccc atcacgtcgt cgacgtgac cgaagaagac gtcgtggcc
120 ccatcgaata tctggtcgcg ttgcacgagg gtcagaccac gatgaccgtt cccggcggcg 180
tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat 208

<210> 17 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium

celatum <400> 17 tcaaggagaa gcgctacgac ctgcgcggg tgggccgcta caaggtcaac
aagaagctcg 60 gcctgaacac cgctccccg atcacgacga ccactctgac cgaagaggac gtcgtcgcc
120 ccatcgagta cctggtcgc ctgcacgagg gccacaccac gatgaccgtc ccgggcggag 180
tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat 208

<210> 18 <211> 211 <212> DNA <213> Mycobacterium

flavescens <400> 18 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tgggtcgta caaggtcaac
aagaagctgg 60 gcatcaccga gaacccggcc gacacgacct cgaccacgt gaccgaagag gacgtcgtc
120 ccaccatga gtacctggtg cggtgcac agggcgacaa gacgatgacc gtcccgggtg 180
gagtcgaggt gccgtcgag gtcgacgaca t 211

<210> 19 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium

fortuitum <400> 19 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tgggccgcta caaggtcaac
aagaagctgg 60 gcctgaacgc cgccagccg atcacgtcgt cgactctgac cgaggaagac gtcgtcgcc
120 ccatcgagta cctggtcgc ctgcacgagg gccagaccac gatgaccgtc cccggcggcg 180
tcgaggtccc ggtcgaggtg gacgacat 208

<210> 20 <211> 205 <212> DNA <213> Mycobacterium

intracellulare <400> 20 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcgcgtg tcggccgcta
caaggtcaac aagaagctcg 60 gcctgcacgc gggcgagccg atcaccagct cgacgtgac cgaggaaga
gtcgtcgcca 120 ccatcgagta cctggtcgc ctgcacgagg gccagcccac gatgaccgtc cccggcatc
180 aggtgccggt ggagaccgac gacat 205

<210> 21 <211> 214 <212> DNA <213> Mycobacterium

abscessus <400> 21 tcaaggagaa gcgctacgat ctggcccgcg tgggtcggtta caaggtgaac
 aagaagctgg 60 gcctgggcgg caccaatccg gctcaggtga ccaccaccac cctcaccgag gaagacgtc
 120 tcgccaccat cgagtacctg gtgcgcctgc acgagggcca gaccacgatg accgcccccg 180
 gcggcgtcga ggtgccggtg gatgtggacg acat 214

<210> 22 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium
 africanum <400> 22 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccgcg tcggtcgcta taaggtcaac

aagaagctcg 60 ggctgcatgt cggcgagccc atcacgtcgt cgacgtgac cgaagaagac gtcgtggcc
 120 ccatcgaata tctgggtccgc ttgcacgagg gtcagaccac gatgatcgtt ccgggcggcg 180
 tcgaggtgcc ggtggaaacc gacgacat 208

<210> 23 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium
 haemophilum <400> 23 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg ttggtcgtta caaggtcaac

aagaagctcg 60 ggttgacgc cggtagccg atcacgagct cgacgtgac cgaagaggac gtcgtcgcc
 120 ccatcgagta cctgggtccgg ctgcatgagg gtcagtcgac gatgaccgtt ccaggtggcg 180
 tcgaggtgcc agtggatact gacgacat 208

<210> 24 <211> 208 <212> DNA <213> Mycobacterium
 xenopi <400> 24 tcaaggagaa gcgctacgac ctggcccggg tggccgcta caaggtcaac

aagaaactcg 60 ggctgaacac cgagaatgcg ccaaccacca cgaccctgac cgaagaggac gtcgtcgcc
 120 ccatcgaata cctgggtgcgc ttgcacgagg ggcacgccac gatgaaggtc cccggtggcg 180
 tcgaggtgcc ggtggagacc gacgacat 208

<210> 25 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> PCR amplification primer for amplifying the gene

of strains of Mycobacterium <400> 25 tcaaggagaa gcgctacga
19 <210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> PCR amplification primer for amplifying the gene
of strains of Mycobacterium <400> 26 ggatgttgat cagggtctgc

20